

TransNGS® DNA Library Prep Kit for Illumina®

DNA文库构建试剂盒 适配illumina平台

使用前请仔细阅读说明书

版本号: Version 2.0



使用前请仔细阅读说明书

目录号: KP201

保存: -18°C及其以下温度下保存一年。

产品说明

TransNGS[®] DNA Library Prep Kit for Illumina[®] 是针对 Illumina 高通量测序平台开发的, 适用于将 1 ng-1 μg 片段化的 dsDNA 高效快速地构建为测序文库试剂盒。本试剂盒的样本可为超声打碎的基因组 DNA、酶切产物、核酸扩增产物、免疫共沉淀 DNA (ChIP DNA)、石蜡切片 DNA (FFPE DNA) 等片段化的 dsDNA, 并可结合外显子或其它靶向捕获试剂 (包括 Agilent SureSelect[®] 和 Roche NimbleGen SeqCap[®] EZ 系列) 进行外显子测序或靶向捕获测序。

特点

- 适用样本类型广泛。
- 高文库转化率。

适用范围

- 全基因组测序。
- 靶基因测序。
- 外显子测序 / 其它靶向捕获测序。
- 宏基因组测序。
- 免疫共沉淀测序。

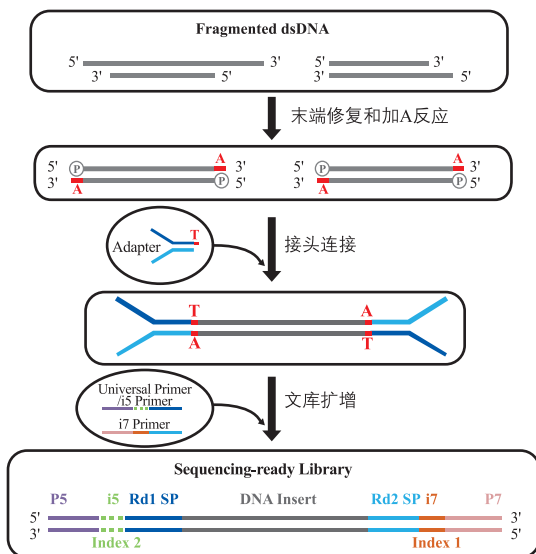
试剂盒组成

Component	KP201-11-V2 (12 rxns)	KP201-03-V2 (96 rxns)
End-repair and A-tailing Reaction Mix	120 μl	960 μl
End-repair and A-tailing Enzyme Mix	60 μl	480 μl
<i>TransNGS</i> [®] Adapter for Illumina [®] (16 μM)*	60 μl	480 μl
Adapter Dilution Buffer	600 μl	5 ml
Adapter-ligation Buffer III	360 μl	4×720 μl
Adapter-ligation Enzyme II	60 μl	480 μl
<i>TransNGS</i> [®] Library Amplification SuperMix (2×)	300 μl	4×600 μl
<i>TransNGS</i> [®] Universal Primer Mix for Illumina [®] *	60 μl	480 μl
Library Elution Buffer	2 ml	4×4 ml
Nuclease-free Water	1 ml	5 ml

* 本试剂盒提供的 Adapter 和 Universal Primer 分别适配通用型短接头和含 Index 长接头建库, 请根据需要二选一, 切勿同时使用。



文库构建原理示意图及流程图



文库构建原理示意图
(i5 位置以虚线表示是指有些文库没有此 Index。)



文库构建流程图



文库结构

本试剂盒使用 TransNGS® Dual Index (或 Index/UDI) Primers Kit for Illumina® (目录号: KI241/KI251), 或 TransNGS® UDI Indexed Adapter Kit for Illumina® (目录号: KI341), 所得文库结构如下:

5'-AATGATACGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCC
GATCT-XXXXXXXX-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC[i7]ATCTCGTATG
CCGCTCTTCTGCTTG-3'

i5: Index 2, 8 bases;

i7: Index 1, 8 bases;

-XXXXXXXX-: 插入序列。

起始样本要求

起始样本为 1 ng-1 µg 溶于 Nuclease-free Water 或 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 的片段化 dsDNA, 请使用 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8-2.0 之间的高纯度样本。DNA 浓度测定需使用基于特异识别 dsDNA 的荧光染料法, 如 Qubit 或荧光染料 PicoGreen。起始样本量指准备进行末端修复、加 A 尾的片段化 dsDNA 量, 如片段化过程中有损失, 或片段化后进行片段纯化或分选等处理, 文库构建开始前请再次精确定量。

文库构建

自备试剂: 新鲜配制的 80% 乙醇, MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401), 含有 Index 的引物, TransNGS® Dual Index/UDI primers Kit for Illumina® (目录号: KI241/KI251), 或含有 Index 的接头, TransNGS® UDI Indexed Adapter Kit for Illumina® (目录号: KI341)

- 以下操作步骤不包含片段分选步骤, 片段分选可在末端修复前、接头连接后或文库扩增后进行, 且只需进行一次。推荐在接头连接后或文库扩增后进行分选。
- 使用 MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401) 进行片段分选的参考条件见附表 1。
- 如起始样本量 ≤ 50 ng, 不建议在接头连接后进行分选, 可在文库扩增后进行分选。

1、末端修复和加 A 反应

(1) 将无菌 PCR 管置于冰上, 加入

Component	Volume
Fragmented dsDNA	Variable
Nuclease-free Water	Variable
End-repair and A-tailing Reaction Mix	10 µl
End-repair and A-tailing Enzyme Mix	5 µl
Total volume	60 µl

注意: 如样本数量大于 1, 可先将反应试剂混匀于一管, 再分到每个反应管中。混匀后的反应试剂随着放置时间的延长, 效率会有所下降, 因此尽量现用现配。

(2) 移液枪吹吸混匀, 点甩离心收集管壁上的液体。

(3) 将反应管置于 PCR 仪中, 进行以下孵育步骤 (盖子温度 ≥ 80°C)

28°C 15 min

68°C 15 min

≤ 10°C Hold



2. 接头连接

- (1) 冰上溶化 *TransNGS*[®] Adapter for Illumina[®]/*TransNGS*[®] UDI Indexed Adapter for Illumina[®] (KI341), 并参考下表准备合适浓度的 Adapter。

起始样本量	Adapter 稀释倍数	稀释后 Adapter 浓度
100 ng ≤ x ≤ 1 μg	不稀释	16 μM
25 ng ≤ x < 100 ng	稀释 2 倍	8 μM
5 ng ≤ x < 25 ng	稀释 10 倍	1.6 μM
1 ng ≤ x < 5 ng	稀释 25 倍	0.6 μM

- (2) 将上步反应结束的 PCR 管置于冰上, 依次加入。

Component	Volume
合适浓度的 Adapter	5 μl
Adapter-ligation Buffer III	30 μl
Adapter-ligation Enzyme II	5 μl
Total volume	100 μl

注意: 切勿将 Adapter 与缓冲液、酶提前混为 mix, 可能会导致大量接头峰产生。

- (3) 移液枪吹吸混匀, 点甩离心收集管壁上的液体。
(4) 将反应管置于 PCR 仪中, 20°C 孵育 15 分钟 (盖子不加热)。连接产物可立即进行纯化, 或于 -20°C 保存。

3. 接头连接产物纯化

推荐使用 0.8× *MagicPure*[®] Size Selection DNA Beads (目录号: EC401) 进行产物纯化。

* 本试剂盒搭配接头使用时, 推荐 0.4× *MagicPure*[®] Size Selection DNA beads 进行产物纯化。

注意: 如果样本投入量较低, 可在文库扩增后进行分选; 或不进行纯化直接进行分选, 即加入 Nuclease-free Water 将连接后体系补足至 150 μl, 分选步骤参见步骤 4. 接头连接产物分选, 并依据附录表 1 对磁珠比例进行调整。

使用 0.8× 磁珠纯化的具体操作如下:

- 从 2-8°C 取出磁珠, 室温静置 30 分钟后备用。
- 振荡磁珠使其充分混匀, 吸取 80 μl 磁珠 (0.8×) 加入上步产物中。
- 移液枪吹吸混匀, 室温静置 5 分钟。
注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。
- 将反应管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清 (约 5 分钟), 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上, 弃上清。
注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠, 否则会影响最终产量。
- 保持反应管在磁力架上, 向管中加入 200 μl 新鲜配制的 80% 乙醇, 不要吹吸磁珠, 室温静置 30 秒, 弃上清。
注意: 一定要使用新鲜配制的乙醇, 否则会影响实验结果。
- 重复步骤 (5) 一次。
- 保持反应管在磁力架上, 室温晾干磁珠。
注意: 切勿加热晾干, 否则会影响最终产量。
- 将反应管移出磁力架, 加入 23 μl Library Elution Buffer。移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠, 室温静置 2 分钟。
- 将反应管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清 (约 2 分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。
注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 室温静置时间可延长至 5 分钟, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。
- 小心吸取 20 μl 洗脱液转移到干净 PCR 管中, 进行下步文库扩增反应, 或于 -20°C 保存。
注意: 低浓度 DNA 不宜稳定保存, 如起始样本量 ≤ 50 ng, 建议立即进行文库扩增, 不建议 -20°C 保存。如按此说明继续进行分选步骤, 建议采用 100 μl 洗脱体系; 如样本投入量低, 需要在文库扩增后进行分选, 则按照 20 μl 洗脱体系进行洗脱。

4. 接头连接产物分选 (可选)

注意: 如样本投入量 ≥ 50 ng, 建议在连接后进行分选; 如样本投入量 < 50 ng, 建议在文库扩增后进行分选, 以减少 DNA 损失。



按照下列步骤和比例进行分选，最终文库主峰位置在 450 bp 左右。

- (1) 从 2-8℃取出磁珠，静置 30 分钟平衡至室温。
 - (2) 向待分选产物中加入 Nuclease-free Water 至终体积 100 μ l。
 - (3) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取 65 μ l 磁珠 (0.65 $\times$) 加入上述待分选文库产物中。移液枪调整至 ≥ 80 μ l,充分吹吸混匀。
 - (4) 室温静置 5 分钟。
 - (5) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约 5 分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，吸取 160-162 μ l 上清至一新管中。注意不要吸入磁珠。
 - (6) 向 (5) 上清中加入 15 μ l 磁珠 (0.15 $\times$)，移液枪调整至 ≥ 80 μ l，充分吹吸混匀。
 - (7) 室温静置 5 分钟。
- 注意：混匀不充分会显著影响实验结果。
- (8) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约 5 分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。
- 注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终产量。
- (9) 保持反应管在磁力架上，向管中加入 200 μ l 新鲜配制的 80% 乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置 30 秒，弃上清。
- 注意：一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。
- (10) 重复步骤 (9) 一次。
 - (11) 保持反应管在磁力架上，室温 2-5 分钟晾干磁珠。
- 注意：切勿加热晾干，否则会影响最终产量。
- (12) 将反应管移出磁力架，加入 22 μ l Library Elution Buffer。移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置 5 分钟。
 - (13) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约 5 分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。
- 注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至 5 分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。
- (14) 小心吸取 20 μ l 洗脱液转移到干净 PCR 管中，产物可于 -20℃保存。

5. 文库扩增

- (1) 将无菌 PCR 管置于冰上，加入

Component	针对通用型短接头	针对含 Index 长接头
上步纯化产物	20 μ l	20 μ l
TransNGS® Library Amplification SuperMix (2 $\times$)	25 μ l	25 μ l
TransNGS® Universal Primer Mix for Illumina®	-	5 μ l
i5 Primer	2.5 μ l	-
i7 Primer	2.5 μ l	-
Total volume	50 μ l	50 μ l

- (2) 移液枪吹吸混匀，点甩离心收集管壁上的液体。
- (3) PCR 仪中进行以下扩增程序。

98℃	3 min	} 2-14 cycles*
98℃	30 sec	
60℃	30 sec	
72℃	30 sec	
72℃	3 min	
$\leq 10^\circ\text{C}$	Hold	

* 针对不同的起始样本量，文库产量参照附录表 2；若扩增前进行分选，建议增加 1-2 个扩增循环数。

6. 文库扩增产物纯化

推荐使用 1.0 $\times$ MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号:EC401) 进行产物纯化。TransNGS® Library Amplification SuperMix (目录号:KA101) 不会影响磁珠纯化的片段大小，此步纯化也可根据需要增大 (获得含更小插入片段的文库) 或者减小磁珠比例 (减少引物残留)。如纯化后需要进行片段分选，洗脱时推荐使用 105 μ l Library Elution Buffer，转移 100 μ l 洗脱产物至干净 1.5 ml 离心管中，再进行片段分选。



使用 1.0× 磁珠纯化的具体操作如下:

- (1) 从 2-8℃取出磁珠, 室温静置 30 分钟后备用。
- (2) 振荡磁珠使其充分混匀, 吸取 50 μ l 磁珠 (1.0×) 加入上步产物中。
- (3) 移液枪吹吸混匀, 室温静置 5 分钟。
注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。
- (4) 将反应管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清 (约 5 分钟), 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上, 弃上清。
注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠, 否则会影响最终产量。
- (5) 保持反应管在磁力架上, 向管中加入 200 μ l 新鲜配制的 80% 乙醇, 不要吹吸磁珠, 室温静置 30 秒, 弃上清。
注意: 一定要使用新鲜配制的乙醇, 否则会影响实验结果。
- (6) 重复步骤 (5) 一次。
- (7) 保持反应管在磁力架上, 室温晾干磁珠。
注意: 切勿加热晾干, 否则会影响最终产量。
- (8) 将反应管移出磁力架, 加入 23 μ l Library Elution Buffer。移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠, 室温静置 2 分钟。
- (9) 将反应管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清 (约 2 分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。
注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 室温静置时间可延长至 5 分钟, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。
- (10) 小心吸取 20 μ l 洗脱液转移到干净 1.5 ml 离心管中, 产物可于 -20℃保存。

附录

表 1 使用 *MagicPure*® Size Selection DNA Beads 片段分选参照表

文库平均长度 (bp)		~320	~470	~670
文库插入片段长度 (bp)		~200	~350	~550
末端修复前进行分选	第一次体积比 (DNA Beads: DNA)	1.0×	0.7×	0.55×
	第二次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.25×	0.2×	0.15×
接头连接产物纯化后进行分选	第一次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.9×	0.68×	0.56×
	第二次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.2×	0.15×	0.12×
接头连接产物不纯化直接分选	第一次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.35×	0.25×	0.15×
	第二次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.15×	0.15×	0.15×
文库扩增产物纯化后进行分选	第一次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.85×	0.65×	0.57×
	第二次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.15×	0.15×	0.1×

注意: 片段分选只需在三处可选位置的其中之一处进行, 为了片段分选的精确性, 建议片段分选前的样本为精确的 100 μ l。三处可选位置的磁珠比例不同是由插入片段两端的序列长度不同引起的。
由于不同样本片段长度分布的差异, 使用相同的条件进行分选时, 所得产物片段长度也会有所差异。

表 2 不同起始样本量产出 100 ng/1 μ g 文库推荐扩增循环数

样本起始量	推荐扩增循环数 *	
	100 ng 文库	1 μ g 文库
1 μ g	--**	2-3**
500 ng	--**	3-4
100 ng	2-3**	5-6
50 ng	2-3	6-7
10 ng	6-7	9-10
5 ng	7-8	10-11
1 ng	10-11	13-14



* 本表中推荐的循环数均为使用超声打碎的平均长度约 300 bp 的高质量来源于人基因组的 Fragmented dsDNA 进行文库构建的经验值，文库构建过程中未进行片段分选。如 DNA 纯度较差、DNA 损伤严重等情况，请适当增加循环数。

** 使用非完整长度的接头 *TransNGS*[®]Adapter for Illumina[®] 时，需至少进行 2-3 个循环，以补齐下游测序所需的 Adapter 序列。

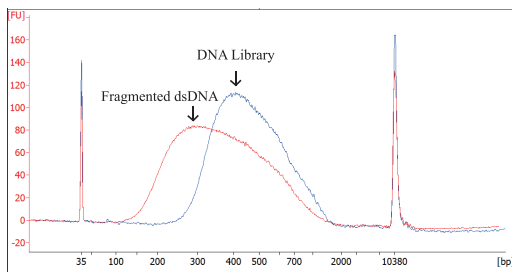


图 1 文库构建前后片段长度分布变化示意图

红线：超声打碎的人类基因组 DNA 样本；

蓝线：经本试剂盒构建后的文库，文库构建过程中未进行片段分选。

注意事项

- 为获得更优质的测序数据，推荐在接头连接后或文库扩增后进行片段分选。
- 反应液的混匀应避免剧烈震荡，以防酶活降低，导致文库构建效率下降。
- 如使用磁珠进行纯化或片段分选，在洗脱时应充分混匀磁珠。充分混匀的磁珠应悬浮均匀，无肉眼可见的颗粒物，且静置 2 分钟后无沉降。
- 浓度小于 1 ng/μl 的样本建议存放于低吸附离心管中，或存放于含 1×*TransNGS*[®] Library Dilution Buffer (目录号：KB101) 的普通离心管中，以免普通离心管壁对核酸样本的吸附降低有效样本浓度。
- 文库扩增循环数越多，测序数据的重复率越高，即有效数据越少。因此，建议在满足下游应用的基础上，尽量使用较少的扩增循环数。
- 为获得较高的文库产量（如用于分子诊断），在文库扩增时推荐 100 μl 的扩增体系（见下表）。

Component	针对通用型短接头	针对含 Index 长接头
上步纯化产物	20 μl	20 μl
<i>TransNGS</i> [®] Library Amplification SuperMix (2×)	50 μl	50 μl
<i>TransNGS</i> [®] Universal Primer Mix for Illumina [®]	-	5 μl
i5 Primer	2.5 μl	-
i7 Primer	2.5 μl	-
Nuclease-free Water	25 μl	25 μl
Total volume	100 μl	100 μl

注：扩增后纯化时，使用 100 μl *MagicPure*[®] Size Selection DNA Beads (1.0×) (目录号：EC401)。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号：V2-202201

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaint@transgen.com

北京全式金生物科技股份有限公司

www.transgen.com

trans@transgen.com

+86-400 898 0321

北京市海淀区中关村东升国际科学园4号楼

